

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Ecole nationale supérieure agronomique

المدرسة الوطنية العليا للفلاحة

Département : Zoologie agricole et forestière

القسم: علم الحيوان الزراعي و الغابي

Spécialité : Zoologie agricole et forestière :

التخصص: علم الحيوان الزراعي و الغابي:

Zoophitiatrie

للنبات الضارة الحيوانات

Mémoire de fin d'étude

En vue de l'obtention du diplôme de Master en Agronomie

THEME

*Etude comparative de l'effet des méthodes d'extraction sur la qualité
de l'ADN génomique de Sitophilus oryzae*

Présenté par : M^{lle}. BENHADDA Sarah

Soutenu le : 22/12/2022

Devant le jury :

Président :	M. DOUMANDJI S.	Professeur (E.N.S.A) El Harrach
Promoteur :	M. CHEBLI A.	M.C.A (E.N.S.A) El Harrach
Co-promoteur :	M. RAHMOUNE B.	M.C.A (E.N.S.A) El Harrach
Examineurs :	M. CHAKALI G.	Professeur (E.N.S.A) El Harrach
	M. BICHE M.	Professeur (E.N.S.A) El Harrach
	Mme. MORSLI S.	M.C.B (E.N.S.A) El Harrach

Promotion : 2017 / 2022

Table des matières

<i>Liste des tableaux</i>	<i>I</i>
<i>Liste des figures</i>	<i>II</i>
<i>Liste des abréviations</i>	<i>V</i>
<i>Introduction générale</i>	<i>1</i>
Chapitre I : Données bibliographiques sur les denrées stockées	4
I.1. Production céréalière dans le monde et en Algérie	4
I.2. Importance des céréales et des légumineuses	5
I.3. Stockage et conservation des denrées alimentaires.....	5
I.3.1. Définition et objectifs.....	5
I.3.2. Modes de stockage	6
I.3.2.1. Stockage en vrac	6
I.3.2.2. Stockage en sac	7
I.3.2.3. Stockage en silos.....	8
I.3.3. Techniques de conservation	9
I.3.3.1. Séchage	9
I.3.3.2. Ventilation.....	9
I.4. Facteurs de détérioration des produits stockés.....	9
I.4.1. Facteurs abiotiques.....	9
I.4.1.1. Température	9
I.4.1.2. Humidité.....	10
I.4.2. Facteurs biotiques.....	10
➤ Insectes ravageurs de denrées stockées.....	11
Chapitre II : Données bibliographiques sur le charançon du riz	14

II.1.	Description morphologique de l'insecte	14
II.1.1	Œuf.....	14
II.1.2	Larve	14
II.1.3	Nymphe.....	15
II.1.4	Adulte.....	15
II.2.	Position systématique et synonymes	16
II.3.	Cycle biologique de l'insecte	17
II.3.1.	Accouplement et ponte	17
II.3.2.	Stade œuf	18
II.3.3.	Stade larvaire	18
II.3.4.	Stade nymphal.....	18
II.3.5.	Stade Adulte et longévité	18
II.4.	Répartition géographique	19
II.5.	Dégâts du charançon du riz et son importance économique	19
II.6.	Lutte contre <i>Sitophilus oryzae</i>	20
II.6.1.	Lutte chimique.....	20
II.6.2.	Méthodes de lutte alternatives.....	21
II.6.2.1.	Lutte mécanique.....	21
II.6.2.2.	Lutte physique.....	21
II.6.2.3.	Lutte par les matériaux inertes : La terre de diatomée.....	22
II.6.2.4.	Lutte biologique	22
II.6.2.5.	Lutte par les huiles essentielles.....	23
Chapitre III : Données bibliographiques sur l'extraction d'ADN.....		25
III.1.	Principales étapes d'extraction d'ADN.....	25
III.1.1.	Lyse cellulaire	25

III.1.1.1.	Lyse mécanique	25
III.1.1.2.	Lyse chimique et enzymatique.....	26
III.1.2.	Elimination des acides nucléiques indésirables	26
III.1.3.	Elimination des protéines.....	26
III.1.4.	Extraction au Phénol	26
III.1.5.	Précipitation de l'ADN	27
III.2.	Différentes méthodes d'extraction d'ADN	28
III.2.1	Méthodes destructives.....	29
III.2.2	Méthodes non-destructives.....	29
III.3.	Facteurs influents l'extraction l'ADN.....	30
Chapitre IV : Matériel et méthodes.....		33
IV.1	Matériel biologique	33
IV.2	Elevage en masse des charançons du riz.....	33
IV.3	Extraction d'ADN	35
IV.3.1.	Choix des méthodes	35
IV.3.2.	Préparation des solutions	35
IV.3.3.	Préparation du matériel animal pour l'extraction	38
IV.3.4.	Extraction d'ADN	39
IV.4	Dosage et contrôle de la qualité d'ADN	44
IV.5	Analyses statistiques	47
Chapitre V : Résultats et Discussion		49
V.1.	Elevage en masse des charançons	49
V.2.	Extraction d'ADN génomique de l'insecte	51
V.2.1.	Evaluation de l'effet des traitements sur l'aspect visuel des extraits.....	52
V.3.	Evaluation de la qualité et de la quantité d'ADN.....	54

V.3.1. Effet des traitements sur la quantité d'ADN	54
V.3.2. Effet des traitements sur la pureté et la qualité d'ADN	55
V.3.3. Evaluation de la qualité d'ADN par l'électrophorèse sur gel d'agarose	57
V.3.4. Estimation des meilleurs protocoles d'extraction d'ADN de <i>S. oryzae</i>	59
<i>Conclusion générale</i>	61
<i>Références bibliographiques</i>	63
<i>ANNEXES</i>	73
<i>ملخص</i>	79
<i>Résumé</i>	79
<i>Abstract</i>	79

ملخص

Sitophilus oryzae (L.) (Coleoptera : Curculionidae) او سوسة الارز هي حشرة مدمرة للحبوب الغذائية المخزنة ، والمعروفة بمقاومتها العالية للمبيدات الحشرية مما يجعل من الصعب السيطرة عليها بالطرق التقليدية ، الأمر الذي يتطلب اللجوء إلى بدائل أخرى. تعد الدراسات الجزيئية للحمض النووي من الوسائل المهمة في تصنيف الحشرات و القضاء عليها، وتعد خطوة استخلاص الحمض النووي الريبي المنزوع الأوكسيجين (DNA) من الحشرات المرحلة الأولى في تلك الدراسات، لذلك هدف البحث الحالي إلى تحسين طريقة استخراج تنكيف مع سوسة الأرز الجزيئية و ذلك بتقوية كفاءة طريقتين مختلفتين لاستخلاص الحمض النووي CTAB و SDS من خلال تعديل في معاملات الاستخراج مثل ؛ تركيز محلول التحلل (0.5 و 1% من SDS ؛ 2 و 4% من CTAB) ، تركيز مذيب الاستخلاص (2:48 و 40:10 من Isoamyl : الكلوروفورم) ونوع محلول الترسيب و غسيل الحمض النووي (الاستبدال بين الإيثانول والأيزوبروبانول) ، تم اختبار جميع الاحتمالات الممكنة تم مقارنته تركيز ونقاوة الحمض النووي المستخلص من كل طريقة باستخدام جهاز المطياف الضوئي وطريقة الكهترهجير فوق هلام الأغاروز 0.8%. أظهرت النتائج أن طريقة CTAB ذات مردود مرتفع من حيث تركيز الحمض النووي والنقاوة، أفضل العلاجات المختارة هي: CTAB2.C1.ISO تليها CTAB1.C1.ET و CTAB2.C1.ET.

الكلمات الرئيسية: سوسة الأرز ، استخراج الحمض النووي، الدراسات الجزيئية ، *Sitophilus oryzae* ، CTAB ، SDS

Résumé

Sitophilus oryzae (L.) (Coleoptera : Curculionidae) est un ravageur des denrées alimentaires stockées, connue pour sa forte résistance aux insecticides le rendant difficile à contrôler par les méthodes conventionnelles, ce qui nécessite un recours vers d'autres alternatives. Les études moléculaires comptent parmi les outils les plus importants pour l'identification des insectes ainsi que pour un contrôle efficace. L'extraction d'ADN en est la première étape. Notre étude a fait l'objet d'optimisation d'une méthode d'extraction adaptée au charançon du riz de l'Algérie. Pour se faire, des comparaisons entre deux méthodes d'extraction d'ADN (CTAB et SDS) ont été réalisées en modifiant les paramètres de l'extraction tels que ; la concentration du tampon de lyse (SDS1 contenant 0.5% et SDS2 contenant 1% de SDS ; CTAB1 avec 2% et CTAB2 avec 4% de CTAB), la concentration du solvant d'extraction (C1 contenait 48 :2 et C2 contenait 40 :10 de chloroforme : Isoamyle) et le type de solution de précipitation et de lavage d'ADN (substitution entre l'éthanol et l'isopropanol), toutes les combinaisons possible ont été testées. Pour évaluer l'effet de chaque traitement sur la qualité et la quantité d'ADN génomique, une quantification d'ADN par spectrophotométrie et une électrophorèse sur gel d'agarose à 0.8% ont été exécutées. Les résultats ont montré que la méthode au CTAB est plus efficace par rapport à celle de SDS, en termes de qualité et de quantité d'ADN obtenu. Les meilleurs traitements sélectionnés sont : CTAB2.C1.ISO suivi de CTAB1.C1.ET et CTAB2.C1.ET.

Mots clés : SDS , CTAB, *Sitophilus oryzae*, charançon du riz, extraction d'ADN, études moléculaires.

Abstract

Sitophilus oryzae (L.) (Coleoptera: Curculionidae) is a pest of stored foodstuffs, known for its high resistance to insecticides making it difficult to control by conventional methods, which requires recourse to other alternatives. Molecular studies are among the most important tools for insect identification and effective control. DNA extraction is the first step. In our study, we optimized an extraction method adapted to the Algerian rice weevil. To do so, comparisons between two DNA extraction methods (CTAB and SDS) were carried out by modifying the extraction parameters such as; the concentration of the lysis buffer (SDS1 with 0.5% and SDS2 with 1% SDS; CTAB1 with 2% and 4% CTAB), the concentration of the extraction solvent (C1 with 48:2 and C2 with 40:10 of chloroform: Isoamyl) and the type of DNA precipitation and washing solution (substitution between ethanol ET and isopropanol ISO), all possible combinations were tested. To evaluate the effect of each treatment on the quality and quantity of genomic DNA, DNA quantification by spectrophotometry and 0.8% agarose gel electrophoresis were performed. The results showed that the CTAB method is more efficient than the SDS method, in terms of quality and quantity of DNA obtained. The best treatments selected were: CTAB2.C1.ISO followed by CTAB1.C1.ET and CTAB2.C1.ET.

Keywords: SDS, CTAB, *Sitophilus oryzae*, rice weevil, DNA extraction, molecular studies.